

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 22 February 2001 (22.02.01)	
International application No. PCT/JP00/04101	Applicant's or agent's file reference FOP-401
International filing date (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)	Priority date (day/month/year) 23 June 1999 (23.06.99)
Applicant KOIDE, Takehiko	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

10 January 2001 (10.01.01)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Antonia Muller

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000年12月28日 (28.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/78811 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C07K 14/81, (71) 出願人 および
C12N 15/15 // A61K 38/57 (72) 発明者: 小出武比古 (KOIDE, Takehiko) [JP/JP]; 〒
679-5165 兵庫県揖保郡新宮町光都二丁目3番23号
Hyogo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04101 (74) 代理人: 高木千嘉, 外 (TAKAGI, Chiyoshi et al.); 〒
102-0083 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広
洋ビル Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2000年6月22日 (22.06.2000) (81) 指定国 (国内): AU, CA, KR, US.
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/176967 1999年6月23日 (23.06.1999) JP 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アベン
ティス ファーマ株式会社 (AVENTIS PHARMA LTD.)
[JP/JP]; 〒107-8465 東京都港区赤坂二丁目17番51号
Tokyo (JP). 2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HUMAN ANTITHROMBIN VARIANTS

(54) 発明の名称: ヒトアンチトロンビン変異体

(57) Abstract: Human antithrombin variants showing a high protease inhibitory activity even in the absence of heparin wherein at least one of the amino acids at the 78-, 278-, 378- and 380-positions in the amino acid sequence of natural human antithrombin is substituted by another amino acid. Preferable examples thereof are human antithrombin variants wherein the amino acid at the 78-position is substituted by Phe; the amino acid at the 278-position is substituted by Ala, Arg, Asn, Gly, His, Tyr or Val; the amino acid at the 378-position is substituted by Lys, Asn or Val; and/or the amino acid at the 380-position is substituted by Ala, Asp, Gly, His, Ile, Leu, Asn, Pro, Arg, Thr, Tyr or Val.

(57) 要約:

ヘパリン非存在下でも高いプロテアーゼ阻害活性を示すヒトアンチトロンビン変異体であって、天然のヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の78位、278位、378位および380位のアミノ酸の少なくとも1個が他のアミノ酸に変換されている。好ましくは、78位がPheにより；278位がAla、Arg、Asn、Gly、His、TyrまたはValにより；378位がLys、AsnまたはValにより；および／あるいは380位がAla、Asp、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Arg、Thr、TyrまたはValにより変換されているヒトアンチトロンビン変異体。

WO 00/78811 A1

明 細 書

ヒトアンチトロンビン変異体

技術分野

本発明は、ヘパリン非存在下でも高プロテアーゼ阻害活性を有する人工のヒトアンチトロンビン変異体に関する。さらに詳しくは、本発明は天然のヒトアンチトロンビン分子の立体構造を遺伝子操作によって改変した変異体であって、ヘパリン結合後の立体構造を有するヒトアンチトロンビン変異体に関する。該変異体は、例えばDIC、血栓性疾病や妊娠中毒症の治療に用いることができるものである。

背景技術

天然のアンチトロンビンはいく種類ものアンチトロンビン活性のあることが示され、アンチトロンビンIからVIまでが提唱された。しかし、今日までにタンパク質として単離されたのはアンチトロンビンIIIだけであることから、現在では、アンチトロンビンIIIは単にアンチトロンビンと呼ばれている。従って本発明において以下アンチトロンビンIIIをアンチトロンビンと称する。

天然のヒトアンチトロンビンは血液凝固系のプロテアーゼ阻害活性を有する分子量58,000の一本鎖の糖タンパク質である。天然のヒトアンチトロンビンは464個のアミノ酸残基からなる前駆体タンパク質として生合成されるが、分泌過程において、32残基からなるシグナルペプチド部分が切り離されるため、血管内を循環する成熟ヒトアンチトロンビンは432個のアミノ酸残基からなる。6個のシステイン残基(Cys)はすべてジスルフィド結合を形成しており、Cys8-Cys128、Cys21-Cys95およびCys247-Cys430の3個所のS-S架橋でヒトアンチトロンビン分子を安定化している。天然のヒトアンチトロンビンには約15%の糖が含まれており、4ヶ所のアスパラギン残基(Asn96、Asn135、Asn155およびAsn192)に複合型糖鎖が結合している。天然のヒトアンチトロンビンの分子中、プロテアーゼの活性中心と直接相互作用し、結合する箇所は反応部位と呼ばれ、ペプチド鎖のC末端近くのArg393-Ser394である。

天然のヒトアンチトロンビンは、 α_1 -アンチトリプシンやヘパリンコファクターIIと同様にセルピン (Serpins) スーパーファミリーに属する血漿タンパク質で、トロンビン、活性化X因子 (Xa因子)、活性化IX (IXa因子) など主要な凝固酵素の活性を制御する凝固系の主要な制御因子である。このような薬理活性を有する天然のヒトアンチトロンビンは、凝固の異常亢進の補正、具体的には血管内凝固症候群 (DIC) や妊娠中の高血圧、蛋白尿、浮腫を主徴とする妊娠中毒症および先天性ヒトアンチトロンビン欠乏に基づく血栓形成傾向の治療を目的として用いられている。

天然のヒトアンチトロンビンはヘパリンに高い親和性があり、ヘパリン存在下でトロンビンやXa因子に対する阻害速度は、それぞれ1000倍と300倍に促進されることが良く知られている。

これまでの一次構造レベルの解析により、天然のヒトアンチトロンビンのN末端領域にヘパリン結合部位があり、C末端近傍にプロテアーゼとの反応部位 (Arg393-Ser394) があることが明らかにされている。また、天然の血中ヒトアンチトロンビンの5~10%は、Asn135に糖鎖が結合していない分子種 (ヒトアンチトロンビン β) で、主要な分子種 (ヒトアンチトロンビン α) よりも高いヘパリン親和性を示す。

天然のヒトアンチトロンビン分子は他の血中セルピンと同様に三次元構造的にはA、BおよびCの3方向に大別される逆平行 β シートからなる多数のストランド (s1A~s4Cと略)、9個の α -ヘリックス (hA~hIと略) とコイル構造部分で構成されるタンパク質である (Stein PE, Carrell RW, Nature Struct Biol 2: 96 1995)。最近、天然型 (native form) と潜在型 (latent form) のアンチトロンビン二量体の2.6 Å分解能でのX線結晶構造 (Skinner R., et al., J. Mol. Biol. 266: 601, 1997) や、高親和性ヘパリンのコア部分のペンタサッカライドとの複合体の2.9 Å分解能での結晶構造が報告され (Jin L., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94: 14683, 1997)、天然のヒトアンチトロンビンとヘパリンの三次元相互作用部位とヘパリン結合によるヒトアンチトロンビン分子

内の動的構造変化が示された。

本発明者はこれまでに、これら天然のヒトアンチトロンビン分子内の動的構造変化から、ヒトアンチトロンビンはヘパリン非存在下ではインヒビターとして「不完全」なセルピンであり、ヘパリン存在下ではじめて「完全」なインヒビターとなると考えた。

これまでの知見をもとに天然のヒトアンチトロンビン中の特定のアミノ酸を変換してヘパリン非存在下でも高いプロテアーゼ阻害活性を有するヒトアンチトロンビン変異体の作製が試みられている。例えば、天然のヒトアンチトロンビンの49位、96位、135位、155位、192位、393位および394位のアミノ酸の1個または2個以上が他のアミノ酸に変換されたヒトアンチトロンビン変異体が開示されている（特開平2-262598公報）。また、11～14位、41～47位、125～133位および384～398位の4つの領域のアミノ酸が、それぞれの領域、単独で又は組み合わせで少なくとも1個、他のアミノ酸に変換されたヒトアンチトロンビン変異体が開示されている（特開平5-339292公報）。しかしながら、これらの変異体の効力は必ずしも十分ではなく、ヘパリン非存在下で更に強いプロテアーゼ阻害活性を持つヒトアンチトロンビン変異体の作製が望まれている。

発明の開示

本発明の目的は、ヘパリン非存在下で完全なインヒビターとして機能し、高いプロテアーゼ阻害活性を有する新規なヒトアンチトロンビン変異体を提供することにある。

天然のヒトアンチトロンビンがプロテアーゼインヒビターとして機能する際、ヒトアンチトロンビン中の反応ループに大きな構造変化がおこる。つまり、天然のヒトアンチトロンビンの分子表面に突出している反応ループが標的プロテアーゼの「基質」として認識され、反応部位 [P1 (Arg393) - P1' (Ser394)] のペプチド結合がプロテアーゼにより切断される。この際、P1位Arg393のカルボニル炭素とプロテアーゼの活性中心Ser195の水酸基の酸素との間にアシ

ル結合が形成されてアシル酵素複合体となると同時に、切断された反応ループのN末端側15残基(P1~P15)がs3Aとs5A間に入り込み、新たなストランド(s4A)となる。この際、Arg393はプロテアーゼを伴って、ヒトアンチトロンビン分子の端から端まで約70 Å移動する。この動的变化がプロテアーゼとの安定な複合体形成に重要と考えられている。天然のヒトアンチトロンビンやプラスミノーゲンアクチベーター1では反応部位が切断されていないにもかかわらず、s4Aとして分子内に挿入された潜在型(latent form)の存在も知られており、s4Aの形成がセルピンの安定な構造と考えられている。

天然型 α -アンチトリプシンの反応ループは分子表面に完全に露出しており、P1位Met358の側鎖が分子の外側に配向され、セリンプロテアーゼの活性部位と相補的な立体配座(コンフォメーション)を形成しているので、プロテアーゼとの反応性が高く、切断後の反応ループの分子内挿入が起こりやすい。しかし、天然のヒトアンチトロンビンのP1位Arg393の側鎖は分子の内側に配向されているためプロテアーゼとの反応性がきわめて低い(Jin L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 14683, 1997)。本発明者はさらに重要な点として、天然のヒトアンチトロンビンの反応ループがP14位(Ser380)とP15位(Gly379)においてストランド内に入り込んでいるため、ストランドに歪を与え、切断された反応ループの挿入も起こりにくい点に注目した。ヘパリンが天然のヒトアンチトロンビンに結合するとヒトアンチトロンビン分子中の様々な部位で立体構造上の変化がおこるが、このP14位(Ser380)とP15位(Gly379)のアミノ酸はヘパリン結合のアロステリック的影響(立体障害的な影響)を受けてストランドから押し出され、 α -アンチトリプシンと同じ位置に移動する(Jin L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 14683, 1997)。

本発明者は、前述のヒトアンチトロンビン、プラスミノーゲンアクチベーター1および α_1 -アンチトリプシン中のそれぞれの反応ループに関する立体構造変化を解析、検討することにより、天然のヒトアンチトロンビン中のP14位(Ser380)がヘパリン非存在下で完全なインヒビターとして機能し、高い

プロテアーゼ阻害活性を有する適切な立体構造を作製するための重要な部位であると判断した。さらに、本発明者は、天然のヒトアンチトロンビンの反応ループにおけるP15～P10位は、近位ヒンジ領域 (proximal hinge) と呼ばれていることから、そのヒトアンチトロンビン中における立体構造的な特徴を検討した。その結果、この近位ヒンジ領域は反応ループがs4Aとして入り込む際のヒンジ (蝶番) の役割を担っていることから、その基部にあたるP16位 (Glu378) もP14位と同様に高いプロテアーゼ阻害活性を有する適切な立体構造を持つヒトアンチトロンビン変異体を作製するために適切なアミノ酸に変換すべき部位であると判断した。

他方、天然のヒトアンチトロンビンの反応ループはプロテアーゼによって切断を受けると、s3Aとs5A間にs4Aとして分子内に挿入されるが、これらのストランド間が開く際に関与している領域がhB (Ser79～Thr90) を中心とするシャッター (shutter) 領域であることが知られている (Stein PE, Carrell RW, Nature Struct Biol 2: 96, 1995)。本発明者は、s3Aとs5A間が開く際には、まず両ストランド間の水素結合が切断された後、これらストランドがhBの溝の上をスライドし、この領域の「開きやすさ」が反応ループの「入りやすさ」と関係するとの知見を得た。つまり、天然のヒトアンチトロンビンのシャッター領域はs3Aとs5A間の開閉に影響を与え、さらにヘパリンとの結合やアンチトロンビンの活性にも影響を与える重要な領域であり、このシャッター領域の基部にあたる78位 (Leu78) を他のアミノ酸に変換することにより高いプロテアーゼ阻害活性を有する適切な立体構造を持つヒトアンチトロンビン変異体を作製することができると判断した。

次に、本発明者はヘパリン結合による天然のヒトアンチトロンビンの動的構造変化とプロテアーゼ阻害活性の促進について特にヘパリン結合領域の各アミノ酸の立体構造を解析、検討した。これまで、天然のヒトアンチトロンビン中のヘパリン結合領域は、47位のArgがCysに変換されたアンチトロンビン富山 (Koide T., Takahashi K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:289,

1984) などの異常症例の解析や化学修飾実験、さらには部位特異的変異体の解析によって、hAとhDに存在する塩基性アミノ酸残基群であることが明らかにされてきたが、前述のX線結晶構造解析 (Jin L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 14683, 1997) によって、天然のヒトアンチトロンビンのヘパリン由来ペントサッカライド結合部位は、hD (Lys125やArg129の側鎖)、hA (Arg46やArg47の側鎖、およびAsn45の主鎖アミド)、N末端領域 (Lys11、Arg13の側鎖と主鎖アミド) とhC-hD間にペントサッカロイド結合により新生する「P-ヘリックス」(Pはペントサッカロイドに由来する) 中のGlu113の主鎖アミドとLys114の側鎖および主鎖アミドであることが明らかになった。ペントサッカライドが接触すると、Arg46とArg47はそれぞれ17 Åと8 Å移動して糖鎖の硫酸基と水素結合を形成する。また、hDはs2Aとs3Aを押す方向へ約10度傾き、そのN末端側のGlu113~Gln118のコイル構造が2回転のhPとなり、hDに対して直角方向に形成される。さらに、hDのC末端側も1.5回転分のヘリックスが形成されて、Arg132、Lys133、Lys136の側鎖がペントサッカライド結合部位の方向を向くようになる。これらの残基はペントサッカライドとは離れているので、両者の間に水素結合は形成されないが、長鎖ヘパリンとは相互作用する可能性が高いと考えられている。また、hDが伸長することによるアロステリック効果で、上述のヒトアンチトロンビンの天然型ではストランド内に入り込んでいた反応ループ内のP14、P15位のアミノ酸残基が押し出され、ストランドの歪みがなくなるとともにP1位Arg393の側鎖が分子の外側を向くようになり、インヒビターとして反応しやすい形に変換される (Pike RN, et al., J. Biol. Chem. 272: 19652, 1997)。また、ヒトアンチトロンビンのN末端部分 (Ile22~Arg46) は、ペントサッカライドが結合すると大きく移動してアンチトロンビン-ペントサッカライド複合体を安定化する立体的なゲートとしての役割を担っている (Fitton, HL, et al., Protein science 7: 782, 1998)。天然のヒトアンチトロンビンの天然型 (native form) と潜在型 (latent form) の立体構造を比較すると、天然型のhDはわずかにねじれており、ヘパリン結合部位であるArg47、Lys125およ

びArg129はペントサッカライド結合領域の方向を向き、Arg129のN ϵ 基はAsp278の側鎖と水素結合を形成して側鎖を安定化することにより、ペントサッカライドの硫酸基とイオンの相互作用をしやすくしている。しかし、潜在型(latent form)では、hDはまっすぐに伸び、Arg47はSer112と、Lys125はIle7と水素結合しており、ヘパリン結合に重要なアミノ酸残基の領域はすべてヘパリン結合領域の方向に向いていない(Skinner R., et al., J. Mol. Biol. 266:601, 1997)。そこで、本発明者はArg129とAsp278の水素結合をあらかじめ切っておくことで、ヘパリン非存在下であってもヘパリン存在下と類似の立体構造に変化させることができると判断した。そこで、Arg129と水素結合している278位(Asp278)のアミノ酸を他のアミノ酸に変換することにより高いプロテアーゼ阻害活性を有する適切な立体構造を持つアンチトロンビン変異体を作製できると考えた。

このように、本発明者はこれまでに解析された天然のヒトアンチトロンビンのヘパリン結合によるアンチトロンビンの動的構造変化に関する情報を検討したうえで、天然のヒトアンチトロンビンのプロテアーゼ阻害活性促進に好ましい立体構造上の変換部位を導き出した。すなわち、天然のヒトアンチトロンビンの反応ループのヒンジ領域、s4A形成時のヒンジ領域、さらにヘパリン結合に関連する部位を1または2以上他のアミノ酸に変換することにより高いプロテアーゼ阻害活性を有する適切な立体構造を持つヒトアンチトロンビン変異体を作製することができるとの結論を得た。このような結論に基づき、本発明者はヒトアンチトロンビン変異体の改良を鋭意研究した結果、高いプロテアーゼ阻害活性を有する適切な立体構造を持つ新規なヒトアンチトロンビン変異体作製に成功し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、天然のヒトアンチトロンビンの変異体であって、天然のヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の78位、278位、378位および380位のアミノ酸の少なくとも1個が他のアミノ酸に変換されていることを特徴とするヒトアンチトロンビン変異体よりなる。これらのヒトアンチトロンビン

変異体のうち、次のものが特に好ましい：

ヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の78位がPheに変換されているヒトアンチトロンビン変異体、

ヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の278位がAla、Arg、Asn、Gly、His、TyrおよびValから選ばれるアミノ酸に変換されているヒトアンチトロンビン変異体、

ヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の378位がLys、AsnおよびValから選ばれるアミノ酸に変換されているヒトアンチトロンビン変異体、

ヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の380位がAla、Asp、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Arg、Thr、TyrおよびValから選ばれるアミノ酸に変換されているヒトアンチトロンビン変異体。

さらに本発明は上記ヒトアンチトロンビン変異体をコードしているDNAよりなる。

図面の簡単な説明

第1図は、AT組換え変異体発現ベクターの構築（Ser380Hisの例）を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の新規なヒトアンチトロンビン変異体は部位特異的変異導入法によってヘパリン結合後の立体構造に類似する変異体を作製した。

以下に、具体的な変異体作製方法を記載し、本発明をさらに具体的に説明する。

天然型アンチトロンビンcDNA（1本鎖）2.5 μ g（10 μ l）にアミノ酸置換のための変異プライマー（0.475 OD/ μ l）30 μ lをアニーリングさせ、DNAポリメラーゼで全長を合成させた。次に、塩基配列を決定して変異導入を確認した。各アンチトロンビン変異体cDNA（1.4kb）をpcD2ベクターのEcoRI部位に組み込み、EcoRIとPstIで切り出して、挿入配列の方向を確認した。順方向に組み込まれたものについて、大量調製のために、リン酸カルシウム法で、BHK細胞にトラン

スフェクトした(第1図)。G418でネオマイシン耐性の安定発現細胞を選択、それらをプールした。安定発現BHK(baby hamster kidney)細胞のプールを用いてパルスチェイス実験を行った。直径35mmのディッシュに 5×10^5 個の細胞をまき、一晚培養した。EXPRE35S35S(100 μ Ci/ml)を6.8 μ l添加し、30分ラベル後、培養液をDME/10%FCS、Met、Cysに交換して8時間チェイスを行い、0、0.5、1、2、4、8時間後の培養上清液(CM)と細胞抽出液(CE)を得た。各時間毎のCMとCEを抗体とStaphylosorb™で免疫沈降後、8%SDS-PAGE(+SH)を行い、得られた当該RIバンドのRI量を定量することによって、組み換え変異体の分泌量を定量した。

分泌量の高い変異体については、8時間チェイス後のCMを回収した。回収液500 μ lに対して、トロンビンまたはXa因子を加え、ヘパリン非存在下では、37℃、5分と60分、ヘパリン存在下では、5分反応後、免疫沈降し、10%SDS-PAGE(+SH)で複合体量を定量した。

1) 分泌性

各アンチトロンビン組換え変異体のBHK細胞からの分泌性について、表1にまとめて示した。パルスラベル時の放射線量を100%とした時のチェイス8時間後の細胞内量と分泌量を示したものであるが、天然型組換え体の分泌量が89%であったのに対して、78位のLeuがPheに変換されているLeu78Phe変異体は分泌量が90%であった。また、278位のAspがAla、Gly、HisまたはTyrに変換されている変異体(Asp278Ala、Asp278Gly、Asp278His または Asp278Tyr)では、それぞれ104%、104%、165%または160%と天然型組換え体以上の分泌性が得られた。

一方で、278位のAspがArg、AsnまたはValに変換されている変異体(Asp278Arg、Asp278AsnまたはAsp278Val)では、それぞれ57%、48%または51%の分泌性であった。380位のSerがAla、Arg、Asn、Asp、Gly、His、Pro、Thr、TyrまたはValに変換されている変異体(Ser380Ala、Ser380Arg、Ser380Asn、Ser380Asp、Ser380Gly、Ser380His、Ser380Pro、Ser380Thr、

Ser380TyrまたはSer380Val) では、いずれも良好な分泌性が得られたが、なかでも、AsnとValに変換された変異体では、それぞれ154%と144%と高い分泌性が得られた。

2) トロンビンとの複合体 (TAT) 形成能

各アンチトロンビン組換え変異体のトロンビンとの複合体 (TAT) 形成能を調べた結果を表2にまとめて示した。本発明の最大の効果であるヘパリン非存在下での即時性のTAT形成能は、天然型組換え体のTAT形成能を100%とした相対値が、78位のLeuがPheに変換されているLeu78Phe変異体では131%、278位のAspがHisに変換されているAsp278His変異体では163%、さらに、380位のSerがGlyまたはTyrに変換されているSer380GlyとSer380Tyr変異体では、それぞれ171%と172%であり、いずれも天然型組換え体よりも高性能な変異体が得られている。さらに、表2に示した変異体は、いずれも長時間(120分)のトロンビンとの相互作用においても、天然型組換え体と同程度 (Leu78Phe、Asp278HisおよびSer380Ala変異体)、あるいは天然型組換え体以上 (Asp278Ala、Asp278Val、Asp278Tyr、Ser380GlyおよびSer380Tyr変異体) の安定したTAT形成能を有していた。

また、ヘパリン存在下の即時性のTAT形成能については、いずれも変異体でも保存されており、ヘパリンとの共用による抗血栓症薬としての有効性も示された。

3) Xa因子との複合体 (Xa-AT) 形成能

各アンチトロンビン組換え変異体のXa因子との複合体 (Xa-AT) 形成能を調べた結果を表3にまとめて示した。本発明の最大の効果であるヘパリン非存在下での即時性のXa-AT形成能は、天然型組換え体のXa-AT形成能を100%とした相対値が、78位のLeuがPheに変換されているLeu78Phe変異体では106%であった。また、278位のAspがGly、HisまたはTyrに変換されているAsp278Gly、Asp278HisまたはAsp278Tyr変異体では、それぞれ144%、171%または131%であり、いずれも天然型組換え体よりも高性能な変

異体が得られている。さらに、長時間（60分）のXa因子との相互作用においても、天然型組換え体と同程度（Leu78Phe、Asp278Gly、Asp278HisおよびSer380Tyr変異体）、あるいは天然型組換え体以上（Asp278Val、Asp278TyrおよびSer380Gly変異体）の安定したTAT形成能を有していた。

また、ヘパリン存在下の即時性のXa-A T形成能は、Leu78Phe、Asp278AlaおよびAsp278Gly変異体では、天然型組換え体に比べてほぼ半減しており、ヘパリン非依存性の高性能Xa因子阻害剤として有効であることが示された。一方、Asp278Val、Asp278Tyr、Ser380Gly、Ser380ThrおよびSer380Tyrの各変異体については、天然型組換え体以上のヘパリン存在下の即時性のXa-A T形成能が保存されており、ヘパリンとの共用による抗血栓症薬としての有効性も示された。

表 1 A T組換え変異体の分泌性

パルスラベル時の放射線量を100%とした時の
チェイス8時間後の細胞内量と分泌量

組 換 え 体	細胞内量(%)	分泌量(%)	合 計
天 然 型	1.4	89	90.4
L e u 7 8 P h e	10	90	100
A s p 2 7 8 A l a	16	104	120
A s p 2 7 8 A r g	4.6	57	61.6
A s p 2 7 8 A s n	4.9	48	52.9
A s p 2 7 8 G l y	22	104	126
A s p 2 7 8 H i s	9.2	165	174.2
A s p 2 7 8 T y r	16	160	176
A s p 2 7 8 V a l	4.6	51	55.6
G l u 3 7 8 L y s	15	62	77
S e r 3 8 0 A l a	4.9	79	83.9
S e r 3 8 0 A r g	10	73	83
S e r 3 8 0 A s n	38	154	192
S e r 3 8 0 A s p	10	83	93
S e r 3 8 0 G l y	6.1	128	134.1
S e r 3 8 0 H i s	8.3	120	128.3
S e r 3 8 0 P r o	30	63	93
S e r 3 8 0 T h r	13	122	135
S e r 3 8 0 T y r	11	78	89
S e r 3 8 0 V a l	17	144	161

表 2 A T組換え変異体のT A T複合体形成

組換え体A T	T A T (%) (-)ヘパリン, 5分	T A T (%) (-)ヘパリン, 120分	T A T (%) (+)ヘパリン, 5分
天 然 型	100	100	100
Leu78Phe	131	93	81
Asp278Ala	102	108	99
Asp278His	163	95	89
Asp278Val	90	108	104
Asp278Tyr	105	106	104
Ser380Ala	56	86	118
Ser380Gly	171	112	98
Ser380Tyr	172	122	111

値は天然型組換え体A TのT A T形成能を100%とした相対値である。

表 3 A T組換え変異体のXa-A T複合体形成

組換え体A T	Xa-A T (%) (-)ヘパリン, 5分	Xa-A T (%) (-)ヘパリン, 60分	Xa-A T (%) (+)ヘパリン, 5分
天 然 型	100	100	100
Leu78Phe	106	88	53
Asp278Ala	80	56	44
Asp278Gly	144	87	54
Asp278His	171	80	89
Asp278Val	89	116	136
Asp278Tyr	131	156	161
Ser380Gly	56	114	168
Ser380Thr	8.8	52	128
Ser380Tyr	86	90	105

値は天然型組換え体A TのXa-A T形成能を100%とした相対値である。

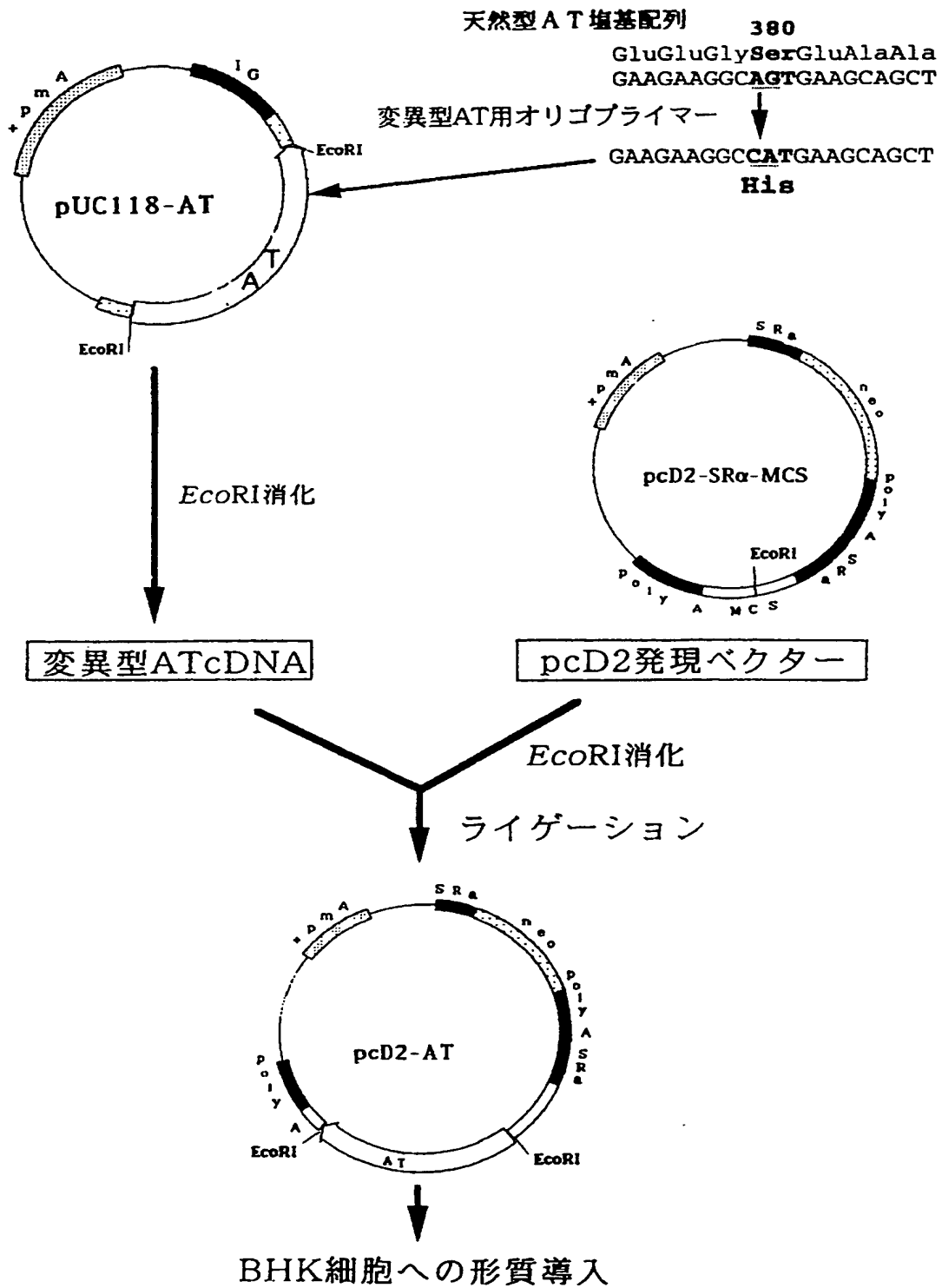
産業上の利用可能性

本発明により、ヘパリン非存在下でも高いプロテアーゼ阻害活性を有する適切な立体構造を持つ新規なヒトアンチトロンビン変異体を提供することができる。本発明の組換えヒトアンチトロンビン変異体は、例えば血栓性疾病や妊娠中毒症の治療薬として有用である。

請 求 の 範 囲

1. ヒトアンチトロンビンの変異体であって、天然のヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の78位、278位、378位および380位のアミノ酸の少なくとも1個が他のアミノ酸に変換されていることを特徴とするヒトアンチトロンビン変異体。
2. 天然のヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の78位がPheに変換されていることを特徴とする請求項1記載のヒトアンチトロンビン変異体。
3. 天然のヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の278位がAla、Arg、Asn、Gly、His、TyrおよびValから選ばれるアミノ酸に変換されていることを特徴とする請求項1記載のヒトアンチトロンビン変異体。
4. 天然のヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の378位がLys、AsnおよびValから選ばれるアミノ酸に変換されていることを特徴とする請求項1記載のヒトアンチトロンビン変異体。
5. 天然のヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の380位がAla、Asp、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Arg、Thr、TyrおよびValから選ばれるアミノ酸に変換されていることを特徴とする請求項1記載のヒトアンチトロンビン変異体。
6. 請求項1記載のヒトアンチトロンビン変異体をコードしているDNA。

第 1 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04101

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K 14/81, C12N 15/15 // A61K 38/57

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K 14/81, C12N 15/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), MEDLINE (STN), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	HUNTINGTON, J. A. et al., "Conformational conversion of antithrombin to a fully activated substrate of factor Xa without need for heparin", Biochemistry (1998), Vol.37, No.10, pp.3272-3277	1, 5-6 2-4
X Y	HUNTINGTON, J. A. et al., "Mechanism of heparin activation of antithrombin. Evidence for reactive center loop preinsertion with expulsion upon heparin binding", Biochemistry (1996), Vol.35, No.26, pp.8495-8503	1, 5-6 2-4
P, X P, Y	FUTAMURA, A. et al., "Serine 380 (P14) → glutamate mutation activates antithrombin as an inhibitor of factor Xa", J.Biol. Chem. (February 2000), Vol.275, No.6, pp.4092-4098	1, 5-6 2-4
Y	EP, 384122, A (BEHRINGWERKE), 29 August, 1990 (29.08.90) & DE, 3901917, A & CA, 2008390, A & PT, 92928, A & AU, 9048639, A & JP, 2-262598, A & US, 5618713, A & US, 5700663, A	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

*

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 September, 2000 (20.09.00)

Date of mailing of the international search report
03 October, 2000 (03.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04101

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, 568833, A1 (EISAI CO LTD), 10 November, 1993 (10.11.93) & AU, 9336761, A & CA, 2093575, A & JP, 5-339292, A & US, 5420252, A	1-6
Y	JP, 9-071600, A (EISAI CO LTD), 18 March, 1997 (18.03.97) (Family: none)	1-6
A	WO, 91/00291, A (AKZO NV), 10 January, 1991 (10.01.91) & AU, 9059393, A & ZA, 9004930, A	
A	MEAGHER, J. L. et al., "Deconvolution of the fluorescence emission spectrum of human antithrombin and identification of the tryptophan residues that are responsive to heparin binding", J. Biol. Chem. (1998) Vol.273, No.36, pp.23283-23289	1-6
A	SHIRK, R. A. et al., "Role of the H helix in heparin binding to protein C inhibitor", J. Biol. Chem. (1994) Vol.269, No.46, pp.28690-28695	1-6
P,A	WO, 99/64568, A2 (BOCK S.C.), 10 December, 1999 (10.12.99) & AU, 9941858, A	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/81, C12N 15/15 // A61K 38/57

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/81, C12N 15/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), MEDLINE (STN), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	HUNTINGTON, J. A. et al. "Conformational conversion of antithrombin to a fully activated substrate of factor Xa without need for heparin", Biochemistry (1998) Vol. 37, No. 10, p. 3272-3277	1, 5-6 2-4
X Y	HUNTINGTON, J. A. et al. "Mechanism of heparin activation of antithrombin. Evidence for reactive center loop preinsertion with expulsion upon heparin binding", Biochemistry (1996) Vol. 35, No. 26, p. 8495-8503	1, 5-6 2-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.09.00

国際調査報告の発送日

03.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, Y	FUTAMURA, A. et al. "Serine 380(P14)→glutamate mutation activates antithrombin as an inhibitor of factor Xa", J. Biol. Chem. (2000. Feb.) Vol. 275, No. 6, p. 4092-4098	1, 5-6 2-4
Y	EP, 384122, A (BEHRINGWERKE) 29. 8月. 1990 (29. 08. 90) & DE, 3901917, A & CA, 2008390, A & PT, 92928, A & AU, 9048639, A & JP, 2-262598, A & US, 5618713, A & US, 5700663, A	1-6
Y	EP, 568833, A1 (EISAI CO LTD) 10. 11月. 1993 (10. 11. 93) & AU, 9336761, A & CA, 2093575, A & JP, 5-339292, A & US, 5420252, A	1-6
Y	JP, 9-071600, A (EISAI CO LTD) 18. 3月. 1997 (18. 03. 97) (ファミリーなし)	1-6
A	WO, 91/00291, A (AKZO NV) 10. 1月. 1991 (10. 01. 91) & AU, 9059393, A & ZA, 9004930, A	1-6
A	MEAGHER, J. L. et al. "Deconvolution of the fluorescence emission spectrum of human antithrombin and identification of the tryptophan residues that are responsive to heparin binding", J. Biol. Chem. (1998) Vol. 273, No. 36, p. 23283-23289	1-6
A	SHIRK, R. A. et al. "Role of the H helix in heparin binding to protein C inhibitor", J. Biol. Chem. (1994) Vol. 269, No. 46, p. 28690-28695	1-6
P, A	WO, 99/64568, A2 (BOCK S. C.) 10. 12月. 1999 (10. 12. 99) & AU, 9941858, A	1-6

ST
K
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference FOP-401	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04101	International filing date (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)	Priority date (day/month/year) 23 June 1999 (23.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/81, C12N 15/15 // A61K 38/57		
Applicant AVENTIS PHARMA LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 10 January 2001 (10.01.01)	Date of completion of this report 23 April 2001 (23.04.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04101

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-7,9-14, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages 8,8/1, filed with the letter of 06 April 2001 (06.04.2001)
- ☒ the claims:
 pages 1-6, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
 pages 1/1, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

11-11-11



1

2

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/04101

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	2, 5	YES
	Claims	1, 6	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-6	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-6	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: J. A. Huntington et al., Biochemistry (1998), Vol. 37, No. 10, pp. 3272-3277

Document 2: J. A. Huntington et al., Biochemistry (1996), Vol. 35, No. 26, pp. 8495-8503

Document 3: EP, 384122, A (Behringwerke), 29 August 1990 (29.08.90)

Document 4: EP, 568833, A1 (Eisai Co., Ltd.), 10 November 1993 (10.11.93)

Document 5: JP, 9-071600, A (Eisai Co., Ltd.), 18 March 1997 (18.03.97)

Claims 1 and 6 are not novel over Document 1 or 2. Documents 1 and 2 disclose human antithrombin variants formed by substitution of amino acid residue 380 in the amino acid sequence of natural human antithrombin by other amino acids, and also DNA sequences coding said variants.

Claim 5 does not involve an inventive step in the light of Documents 1 and 2. Document 1 discloses a human antithrombin variant in which serine³⁸⁰ in the amino acid sequence of natural human antithrombin is replaced by cystein, and Document 2 discloses a human antithrombin variant in which serine³⁸⁰ in the amino acid sequence of natural human antithrombin is replaced by tryptophan. Therefore, a person skilled in the art could easily



conceive of preparing human antithrombin variants in which serine³⁸⁰ in the amino acid sequence of natural human antithrombin is replaced by an amino acid other than tryptophan or cystein.

Claims 1-6 do not involve an inventive step in the light of Documents 1-5. Documents 3-5 disclose the preparation of human antithrombin variants with high protease inhibiting activity in the absence of heparin by substituting amino acids in various position in the amino acid sequence of natural human antithrombin by other amino acids; therefore, a person skilled in the art could easily conceive of substituting amino acids in various position in the amino acid sequence of natural human antithrombin by other amino acids in order to obtain human antithrombin variants with high protease inhibiting activity in the absence of heparin, and then determining the protease inhibiting activity of each of variants in the absence of heparin and selecting human antithrombin variants with high protease inhibiting activity.



国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 F O P - 4 0 1	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。		
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 4 1 0 1	国際出願日 (日.月.年) 2 2 . 0 6 . 0 0	優先日 (日.月.年) 2 3 . 0 6 . 9 9	
出願人 (氏名又は名称) アベンティス ファーマ株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/81, C12N 15/15 // A61K 38/57

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/81, C12N 15/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), MEDLINE (STN), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	HUNTINGTON, J. A. et al. "Conformational conversion of antithrombin to a fully activated substrate of factor Xa without need for heparin", Biochemistry (1998) Vol. 37, No. 10, p. 3272-3277	<u>1, 5-6</u> 2-4
<u>X</u> Y	HUNTINGTON, J. A. et al. "Mechanism of heparin activation of antithrombin. Evidence for reactive center loop preinsertion with expulsion upon heparin binding", Biochemistry (1996) Vol. 35, No. 26, p. 8495-8503	<u>1, 5-6</u> 2-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.09.00

国際調査報告の発送日

03.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4 B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, Y	FUTAMURĀ, A. et al. "Serine 380 (P14) → glutamate mutation activates antithrombin as an inhibitor of factor Xa", J. Biol. Chem. (2000. Feb.) Vol. 275, No. 6, p. 4092-4098	1, 5-6 2-4
Y	EP, 384122, A (BEHRINGWERKE) 29. 8月. 1990 (29. 08. 90) & DE, 3901917, A & CA, 2008390, A & PT, 92928; A & AU, 9048639, A & JP, 2-262598, A & US, 5618713, A & US, 5700663, A	1-6
Y	EP, 568833, A1 (EISAI CO LTD) 10. 11月. 1993 (10. 11. 93) & AU, 9336761, A & CA, 2093575, A & JP, 5-339292, A & US, 5420252, A	1-6
Y	JP, 9-071600, A (EISAI CO LTD) 18. 3月. 1997 (18. 03. 97) (ファミリーなし)	1-6
A	WO, 91/00291, A (AKZO NV) 10. 1月. 1991 (10. 01. 91) & AU, 9059393, A & ZA, 9004930, A	1-6
A	MEAGHER, J. L. et al. "Deconvolution of the fluorescence emission spectrum of human antithrombin and identification of the tryptophan residues that are responsive to heparin binding", J. Biol. Chem. (1998) Vol. 273, No. 36, p. 23283-23289	1-6
A	SHIRK, R. A. et al. "Role of the H helix in heparin binding to protein C inhibitor", J. Biol. Chem. (1994) Vol. 269, No. 46, p. 28690-28695	1-6
P, A	WO, 99/64568, A2 (BOCK S. C.) 10. 12月. 1999 (10. 12. 99) & AU, 9941858, A	1-6

REC'D 04 MAY 2001

WIPO PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
(PCT36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 の書類記号 FOP-401	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/04101	国際出願日 (日.月.年) 22.06.00	優先日 (日.月.年) 23.06.99
国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁷ C07K 14/81, C12N 15/15 // A61K 38/57		
出願人(氏名又は名称) アベンティス ファーマ株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 2 ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
I ☒ 国際予備審査報告の基礎
II ☐ 優先権
III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
IV ☐ 発明の単一性の欠如
V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
VI ☐ ある種の引用文献
VII ☐ 国際出願の不備
VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 10.01.01	国際予備審査報告を作成した日 23.04.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 高堀 栄二	4B 9281
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-7, 9-14 ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 8, 8/1 ページ、 06.04.01 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 1-6 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 項、 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1/4 ページ、 出願時に提出されたもの
図面 第 ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 ページ/図、 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 ページ、 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)という翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)という国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3という翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	2-5	有
	請求の範囲	1、6	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-6	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-6	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : HUNTINGTON, J. A. et al., Biochemistry(1998)Vol. 37, No. 10, p. 3272-3277
 文献2 : HUNTINGTON, J. A. et al., Biochemistry(1996)Vol. 35, No. 26, p. 8495-8503
 文献3 : EP, 384122, A (BEHRINGWERKE) 29. 8月. 1990(29. 08. 90)
 文献4 : EP, 568833, A1 (EISAI CO LTD) 10. 11月. 1993(10. 11. 93)
 文献5 : JP, 9-071600, A (EISAI CO LTD) 18. 3月. 1997(18. 03. 97)

請求の範囲1、6は、文献1又は文献2により新規性を有しない。文献1、文献2には、ヒトアンチトロンビンの変異体であって、天然のヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の380位のアミノ酸が他のアミノ酸に変換されているヒトアンチトロンビン変異体、該変異体をコードするDNAが記載されている。

請求の範囲5は、文献1及び文献2により進歩性を有しない。文献1には、天然のヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の380位のセリンがシステインに置換されたヒトアンチトロンビン変異体が記載されており、また、文献2には、天然のヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の380位のセリンがトリプトファンに置換されたヒトアンチトロンビン変異体が記載されているから、天然のヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の380位のセリンをトリプトファン、システイン以外の他のアミノ酸に置換したヒトアンチトロンビン変異体を製造することは、当業者が容易になし得ることである。

請求の範囲1-6は、文献1-5により進歩性を有しない。文献3-5には、天然のヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の種々の位置のアミノ酸を他のアミノ酸に置換して、ヘパリン非存在下で高いプロテアーゼ阻害活性を有するヒトアンチトロンビン変異体を製造することが記載されているから、ヘパリン非存在下で高いプロテアーゼ阻害活性を有するヒトアンチトロンビン変異体を得ることを目的にして、天然のヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の種々の位置のアミノ酸を他のアミノ酸に置換し、各変異体のヘパリン非存在下でのプロテアーゼ阻害活性を測定して、その中から高いプロテアーゼ阻害活性を有するヒトアンチトロンビン変異体を選抜することは、当業者が容易になし得ることである。



変異体のうち、次のものが特に好ましい：

ヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の78位がPheに変換されているヒトアンチトロンビン変異体、

ヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の278位がAla、Arg、Asn、Gly、His、TyrおよびValから選ばれるアミノ酸に変換されているヒトアンチトロンビン変異体、

ヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の378位がLys、AsnおよびValから選ばれるアミノ酸に変換されているヒトアンチトロンビン変異体、

ヒトアンチトロンビンのアミノ酸配列の380位がAla、Asp、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Arg、Thr、TyrおよびValから選ばれるアミノ酸に変換されているヒトアンチトロンビン変異体。

さらに本発明は上記ヒトアンチトロンビン変異体をコードしているDNAよりなる。

図面の簡単な説明

第1図は、AT組換え変異体発現ベクターの構築（Ser380Hisの例）を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の新規なヒトアンチトロンビン変異体は部位特異的変異導入法によってヘパリン結合後の立体構造に類似する変異体を作製した。即ち、目的とするヒトアンチトロンビン変異体cDNAを、(1)1本鎖pUC118-ATの作成、(2)Sculptor法による変異の導入、(3)変異導入の確認、及び(4)EcoRI消化による切り出しという手順によって作製した。この該変異体cDNAを、同様にEcoRIで消化したpcD2発現ベクターに組み込んで作製されたプラスミドでBHK細胞を形質転換した。この形質転換したBHK細胞を選択培養することにより、目的とするヒトアンチトロンビン変異体を生産した。(第1図)

以下に、具体的な変異体作製方法を記載し、本発明をさらに具体的に説明する。

天然型アンチトロンビンcDNA (1本鎖) 2.5 μ g (10 μ l) にアミノ酸置換のための変異プライマー (0.475 OD/ml) 30 μ l をアニーリングさせ、DNAポリメラーゼで全長を合成させた。次に、塩基配列を決定して変異導入を確認した。各アンチトロンビン変異体cDNA (1.4kb) をpcD2ベクターのEcoRI部位に組み込み、EcoRIとPstIで切り出して、挿入配列の方向を確認した。順方向に組み込まれたものについて、大量調製のために、リン酸カルシウム法で、BHK細胞にトラン

